**平成20年７月 作成（第３版）
*平成19年12月 改訂（第２版）

［食品検査用］

FASTKITエライザ Ver.Ⅱ大豆《取扱説明書》

※本製品をご使用になる前に必ずお読みください。

― 開発の経緯および特徴 ―

食物アレルギーを誘発する可能性が高いとされた卵・乳・小麦・そば・落花生は特定原材料として、食品衛生法によりこれらを含む食品には表示が義務付けられ、大豆については特定原材料に準ずるものとして表示が推奨されています。大豆は多くの食品に含まれており、かつ表示推奨品目の中では患者発生頻度が高いため、特定原材料５品目と同様に、大豆由来タンパク質の含有量の確認、および原材料由来のキャリーオーバーや製造工程でのコンタミネーションなど予期せぬ混入の有無を確認することが重要となります。

本品は、酵素免疫測定法（ELISA法：Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay）を測定原理とする食品中の大豆タンパク質の測定に必要な試薬類が収められた検査キットで、簡単な操作で食品中の大豆由来のタンパク質を測定可能です。

〔特徴〕

1）食品中の大豆タンパク質を高感度に測定可能です。
2）原材料から加工食品まで幅広く適用可能です。

― キットの内容** ―

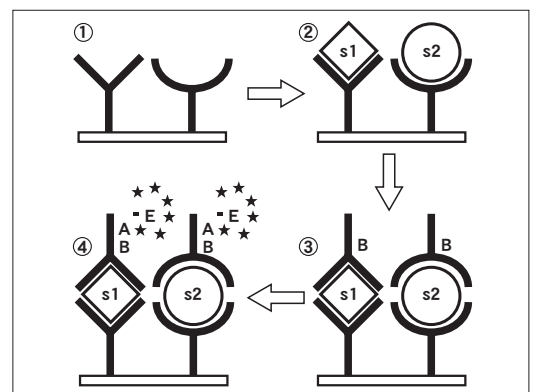
A：抗体固相化プレート（カバー付き）	96ウェル（8ウェル×12列）×１枚
B：標準溶液（50ng/mL）<オリエンタル酵母工業株式会社製> **医薬用外毒物**（2－メルカプトエタノール 0.1%含有）	1.8mL×１本
C：希釈用緩衝液	100mL×１本
D：ビオチン結合抗体	150μL×１本
E：酵素（ペルオキシダーゼ）－ストレプトアビジン結合物	150μL×１本
F：発色剤（TMB）	12mL×１本
G：反応停止液（0.5N硫酸）	12mL×１本
H：濃縮洗浄液（10倍濃縮）	100mL×１本
I：抽出用試薬①（20倍濃縮）	50mL×１本
J：大豆用抽出用試薬②（10倍濃縮）	100mL×１本
K：抽出用試薬③（20倍濃縮） **医薬用外毒物**（2－メルカプトエタノール 40%含有）	50mL×１本
L：取扱説明書	１部

注）大豆用抽出用試薬②の濃度は他の項目（卵、牛乳、小麦、そば、落花生）の抽出用試薬②と異なりますのでご注意ください。

― 目的・性能 ―

・食品中に含まれる大豆タンパク質を1～20ppmの範囲で測定可能。

― 測定原理 ―

①複数の大豆タンパク質と結合する抗体がプレートのウェルの中に固相化されています。
②測定溶液中の複数の大豆タンパク質（s1、s2…）が固相化抗体に捕捉され、大豆タンパク質と固相化抗体の複合体が形成されます。
③これらの複合体にビオチン結合抗体が結合することにより、サンドイッチ複合体が形成されます。
④更に酵素－ストレプトアビジン結合物をビオチン－ストレプトアビジンの反応により結合させた後、酵素基質（TMB）を加えて発色させます。

― 必要な機器 ―

〔試薬の調製〕

・メスシリンダー、ビーカー、マイクロピペット

〔測定溶液の調製〕

・粉砕機（フードカッター）、秤、50mL容量プラスチック製遠沈管（キャップ付）、振とう機、遠心分離機（3,000×g以上、室温での遠心分離可能なものを推奨）、ろ紙、漏斗

〔測定操作およびデータ解析〕

・マイクロピペット、試験管もしくはマイクロチューブ、吸収紙（ペーパータオル）、マイクロプレートリーダー（波長450nmおよび600～650nmのフィルターがセットされたもの）、解析ソフト（4係数Logistic解析が可能なもの）

― 試薬の調製 ―

〔そのまま使用する試薬〕

・希釈用緩衝液：室温（20～25℃）に戻して使用してください。
・発色剤：必要量を遮光容器に分注し、室温(20～25℃)に戻して使用してください。
・反応停止液：室温（20～25℃）に戻して使用してください。

〔調製して使用する試薬〕

・大豆用検体抽出液：抽出用試薬①、大豆用抽出用試薬②、抽出用試薬③および精製水を1：2：1：16の割合で混合し、よく攪拌した後使用してください。

＜大豆用検体抽出液調製例：24検体分調製する場合＞

抽出用試薬①（20倍濃縮）	：	25mL
大豆用抽出用試薬②（10倍濃縮）	：	50mL
抽出用試薬③（20倍濃縮）	：	25mL
精 製 水	：	400mL
合　計	：	500mL

・標準品希釈液：大豆用検体抽出液を希釈用緩衝液にて、20倍に希釈してください。
・標準溶液：下記の希釈例を参考に、標準品希釈液を用いて希釈してください。

＜標準溶液の希釈例＞

標準品濃度(ng／mL)	50	25	12.5	6.25	3.125	1.5625	0.78125	0
標準溶液添加量（μL）	800	400	400	400	400	400	400	0
標準品希釈液添加量（μL）	0	400	400	400	400	400	400	400

・濃縮洗浄液：精製水にて10倍希釈して使用してください。
・ビオチン結合抗体：あらかじめ室温に戻した希釈用緩衝液を用いて100倍希釈し、15分以内に使用してください。
・酵素－ストレプトアビジン結合物：あらかじめ室温に戻した希釈用緩衝液を用いて100倍希釈し、15分以内に使用してください。

＜使用する希釈液および希釈対象＞

希釈対象	標準溶液	抽出後の上清もしくはろ液	ビオチン結合抗体	酵素－ストレプトアビジン結合物
希釈用緩衝液		○	○	○
標準品希釈液	○			

注１）標準溶液、ビオチン結合抗体、および酵素－ストレプトアビジン結合物は使用直前まで冷蔵保存し、使用後は直ちに冷蔵保存してください。
注２）ロット番号の異なる試薬を混合、もしくは差し替えて使用しないでください。
注３）ラベルに測定項目が記載されている試薬（抗体固相化プレート、標準溶液、ビオチン結合抗体、酵素-ストレプトアビジン結合物、大豆用抽出用試薬②）は他の測定項目に使用しないでください。ただし、測定項目の記載がない試薬は全ての測定項目でご使用いただけます。
注４）分注、希釈などのピペット操作は測定精度に大きく影響するため正確に行ってください。また、分注、希釈操作ごとにマイクロピペットのチップを交換してください。
注５）大豆用抽出用試薬②は保管・流通時に固形化しますが、性能上問題ありません。湯煎等で加温融解して使用してください。
注６）本キットに添付されている大豆用抽出用試薬②は他の項目（卵、牛乳、小麦、そば、落花生）の抽出用試薬②と異なります。

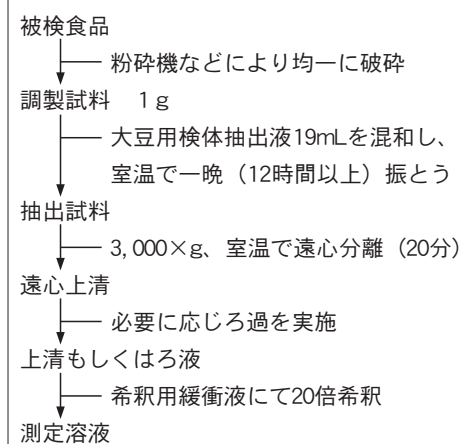
― 抽出操作（一般的な食品における操作例） ―

1）被検食品（検体）を一包装単位毎に粉砕機などにより均一な状態に粉砕したものを調製試料とします　（注１）。
2）調製試料１gをプラスチック製遠沈管に量りとり、大豆用検体抽出液19mLを加えよく混合し、固形分を均等に分散します（注２）。
3）振とう機に遠沈管を横にして置き、室温で一晩（12時間以上）振とうしたものを抽出試料とします（注３）（注４）。
4）抽出試料を3,000×g，室温で20分間遠心分離し、分離された上清を回収、もしくは沈渣が得られない場合にはろ過を行ってください（注５）。
5）回収した上清もしくはろ液を希釈用緩衝液で20倍希釈したものを測定溶液とします（注６）。

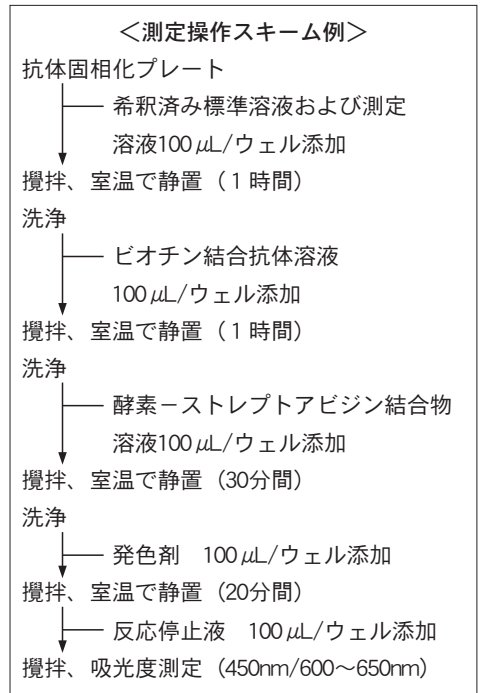
＜抽出操作スキーム例＞

被検食品
　↓―― 粉砕機などにより均一に破砕
調製試料　1g
　↓―― 大豆用検体抽出液19mLを混和し、室温で一晩（12時間以上）振とう
抽出試料
　↓―― 3, 000×g、室温で遠心分離（20分）
遠心上清
　↓―― 必要に応じろ過を実施
上清もしくはろ液
　↓―― 希釈用緩衝液にて20倍希釈
測定溶液

注１）器具類を介したコンタミネーションを防止するため、よく洗浄した器具またはディスポーザブルの器具を使用してください。特に粉砕機やホモジナイザーについては検体ごとに確実に洗浄してください（中性洗剤で洗浄後、アルカリ洗剤に一晩浸け置きする、もしくは 30 分間以上アルカリ洗剤中で超音波洗浄を行ってください）。
注２）調製試料を分散させる際には、あまり泡立たせないよう注意しながらボルテックスミキサーなどを用いて十分に分散させてください。
注３）振とう回数は１分間に 90 ～ 110 往復程度、振とう幅は３cm 程度として、振とうにより液が遠沈管の両端に打ち付けられるように調整してください。また、液面に沿って付着する調製試料を分散させるため、時々遠沈管の上下を入れ替えるなどの操作をしてください。
注４）抽出試料の pH を確認し、必要であれば、中性付近（pH6.0 ～ 8.0）となるように調整してください。
注５）回収する上清の量はなるべく一定とし、可能であれば油層を除去してください。また、正確な結果を得るためにろ過を行うことを推奨します。
注６）回収した上清およびろ液は４℃保存とし、１週間以内に測定してください。１週間以上の保存を行う場合には、冷凍での保存を推奨します。ただし、冷蔵もしくは冷凍での保存期間は食品中の成分の影響により異なります。

ー　測定操作　ー

1）抗体固相化プレートをアルミパウチ袋に入れたまま室温に戻し、使用直前にアルミパウチ袋から取り出してください（注1）。
2）各ウェルに希釈した標準溶液および測定溶液100μLを加えてください（注2）。
3）軽く攪拌した後、室温(20～25℃)で、1時間静置して反応させてください。
4）反応終了後、標準溶液および測定溶液を捨て、各ウェルにあらかじめ希釈した洗浄液250μLを加え、これを捨てる操作を5回繰り返してください(注3)。
5）各ウェルに調製したビオチン結合抗体溶液100μLを加えてください。
6）軽く攪拌した後、室温(20～25℃)で、1時間静置して反応させてください。
7）反応終了後、ビオチン結合抗体溶液を捨て、手順4）と同様に洗浄してください。
8）各ウェルに調製した酵素－ストレプトアビジン結合物溶液100μLを加えてください。
9）軽く攪拌した後、室温(20～25℃)で、30分間静置して反応させてください。
10）反応終了後、酵素－ストレプトアビジン結合物溶液を捨て、手順4）と同様に洗浄してください。
11）各ウェルにあらかじめ室温に戻した発色剤100μLを加えてください。
12）軽く攪拌した後、室温（20～25℃）で、20分間静置して発色させてください。データの再現性を高めるため、遮光条件下での発色を推奨します。
13）各ウェルにあらかじめ室温に戻した反応停止液100μLを加え、軽く攪拌して発色を停止してください（注4）。
14）攪拌後、プレートリーダーにて主波長450nm、副波長600～650nmの吸光度を測定してください。

注1）プレートを分割して使用する場合は、使用しないストリップを必ず乾燥剤入りのアルミパウチ袋に戻し、冷蔵保存してください。
注2）標準溶液および測定溶液の測定には各3ウェルずつ使用することを推奨します。また、標準溶液による標準曲線は測定毎に必ず作成してください。
注3）正確な測定を行うために洗浄操作は非常に重要です。プレートを逆さにしてペーパータオルなどの上で数回強く叩きつけるなどの水切りを行いウェルに残った液と気泡を完全に除去した後、速やかに次の試薬を加えてください。
注4）反応停止液は、0.5N 硫酸を使用しています。取り扱いの際には十分注意してください。

ー　データ解析　ー

1）標準溶液を測定して得られた吸光度から4係数Logistic解析（4－パラメーター解析）を用いて標準曲線グラフを作成します（注1）。
2）作成した標準曲線から、測定溶液中の大豆タンパク質濃度（ng/mL）を読み取ります。
3）読み取った大豆タンパク質濃度もしくは算出した大豆タンパク質補正濃度に抽出操作時の希釈倍率（400倍）を乗じて食品中の大豆タンパク質濃度を算出します。

注1）4－係数 Logistic 解析以外の解析方法により、標準曲線グラフを作成したとき、測定結果が異なる場合があります。

ー　性能　ー

〔試験方法〕

平成14年11月6日付け食発第1106001号厚生労働省医薬局食品保健部長通知「アレルギー物質を含む食品の検査方法について」（平成17年10月11日付け食安発第1011002号当職通知、平成18年3月24日付け食安発第0324001号当職通知、および平成18年6月22日付け食安発第0622003号当職通知により一部改正）に示されている「アレルギー物質を含む食品の検査方法を評価するガイドライン」に従い試験を行った結果、以下の評価基準を満たしていることが確認されています。

〔回収率〕

試験室数8以上、試料数5以上（試料に含まれる大豆タンパク質は10μg/gであること）で実施した試験室間バリデーションで、50％以上、150％以下の回収率を示すこと。

〔室間精度〕

試験室数8以上、試料数5以上（試料に含まれる大豆タンパク質は10μg/gであること）で実施した試験室間バリデーションで、25％以下の室間精度を示すこと。

― 偽陽性・偽陰性 ―

1）特定原材料５品目（卵、牛乳、小麦、そば、落花生）との交差反応性は認められません。
2）当社での試験の結果、きび*が偽陽性を示すことが確認されています。その他の偽陽性については、日本ハム㈱中央研究所ホームページにて公開している「偽陽性・偽陰性を示す食品一覧」をご参照ください。
3）非常に高濃度のタンパク質存在下では、非特異的な反応が起こる可能性があります。この場合、適当な濃度に希釈して測定を行ってください。ただし、20倍に希釈済みの測定溶液を更に希釈する際には、必ず標準品希釈液を使用してください。
4）醤油、大豆油、一部の納豆、一部の大豆ペプチド、一部の大豆イソフラボン、および一部の大豆レシチンは大豆タンパク質の含有量が少ないため、もしくは製造の過程で大豆タンパク質が分解されているため、偽陰性を示す可能性があります。

― 使用上または取り扱い上の注意 ―

〔一般的な注意事項〕

1）この取扱説明書をよく読み、記載された操作方法に従って使用してください。
2）使用期限の過ぎたキットおよび構成品は使用しないでください。使用期限は、外箱および各構成品ラベルに記載されています。
3）本キットは食品中の大豆タンパク質を測定するための試薬であり、大豆による食物アレルギー発症の有無を診断する試薬ではありません。本キットによる測定結果とアレルギー症状の発症との相関性については確認されていません。
4）大豆タンパク質の有無については本キットの結果だけでなく、原材料や製造記録の確認等、他の方法と併せて総合的に判断してください。
5）本キットによる測定に使用する機械・器具類の使用方法等については、それぞれの製造元もしくは販売元にご確認ください。
6）本取扱説明書は検査担当者のガイドラインとして作成されています。各検査手順や各々の食品におけるアプリケーションの妥当性については自ら検証してください。
7）商品の仕様については、予告なく変更になる場合があります。

〔危険防止上の注意事項〕

1）本キットの試薬類が、皮膚、粘膜、衣類等に付着しないよう注意してください。
2）誤って試薬が目や口に入った場合には、直ちに水道水で十分に洗い流す等の応急処置を行い、医師の手当てを受けてください。
3）本キットには毒物及び劇物取締法で毒物に指定されている物質が含有されています。使用時には、本キットのMSDSをご確認ください。**

〔廃棄上の注意事項〕

1）本キット、試料ならびに測定溶液等を廃棄する場合には、関係法律（ 毒物及び劇物取締法等 ）および当該地域の条例に従って廃棄してください。または、都道府県知事の許可を受けた産業廃棄物処理業者に委託してください。**

― 保存方法・使用期限 ―

1）保存方法：冷蔵（２～８℃）、遮光にて保存してください（凍結厳禁）。また、盗難、紛失防止の措置を講じてください。**
2）使用期限：製造日より６ヶ月。外箱および各構成品ラベルに記載されています。

― 参考文献 ―

1）食発第1106001号厚生労働省医薬局食品保健部長通知「アレルギー物質を含む食品の検査方法について」（食安発第1011002号通知、食安発第0324001号通知、および食安発第0622003号通知により一部改正）
2）今井孝成、海老澤元宏：平成14年度厚生労働省科学研究報告書
3）丸井英二：食品衛生研究,Vol.52（５），p25－31，2002
4）穐山浩、豊田正武：食品衛生研究，Vol.52（６），p65－73，2002

〔販売元および問い合わせ先〕

外箱側面に記載

〔製造元〕

日本ハム株式会社　中央研究所
〒300－2646　茨城県つくば市緑ヶ原3－3
電話：029(847)7825/FAX：029(847)7824
URL：http://www.rdc.nipponham.co.jp

〔標準溶液製造元〕

オリエンタル酵母工業株式会社
〒174－8505
東京都板橋区小豆沢三丁目6番地10号
電話：03(3968)1111/FAX：03(3968)8624